©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Zur Messung der Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten

I. Die mathematische Ableitung eines Permeabilitätsmaßes für Anelektrolyte

Von Eduard Stadelmann

Aus dem Botanischen Institut der Universität Innsbruck

Mit 6 Textabbildungen

Gedruckt aus Mitteln des Vereins der Freunde der Österreichischen Akademie der Wissenschaften in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. Oktober 1951)

1. Einleitung.

Der Stoffdurchtritt durch das lebende Protoplasma bildet seit jeher ein wichtiges Problem der Plasmaforschung und wurde in zahlreichen Arbeiten nach den verschiedensten Richtungen geprüft. Hiebei lassen sich mehrere Arten des Stofftransportes unterscheiden, die kurz zu kennzeichnen sind.

Da das Wasser bei den Lebensvorgängen eine besondere Rolle spielt und als Lösungsmittel eine von den darin gelösten Substanzen wohl unterschiedene Stellung einnimmt, wird der Wasserdurchtritt (Wasserpermeabilität) vom Durchtritt anderer Substanzen getrennt behandelt. Solche wasserlösliche Stoffe können unter Energieaufwand gespeichert werden (adenoide Tätigkeit des Protoplasten, Overton 1899, Steward 1932 f., Steward u. Mitarbeiter 1932, Brooks and Brooks 1941 u. a.) oder durch bloße Diffusion in die Vakuole gelangen (Stoffpermeation). Letzteres trifft auch für viele Substanzen zu, die im natürlichen Milieu der Zelle nicht vorkommen, trotzdem aber den Protoplasten nicht schädigen. Je nach ihrer Qualität ist das Eindringen in die Vakuole durch osmotische Methoden (osmotisch wirksame Kristalloide), Färbung, Fällung (z. B. Alkaloide) oder an günstigen Objekten (Valonia, Chara) durch

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

direkte mikrochemische Bestimmung (Collander und Bärlund 1933) nachzuweisen. Handelt es sich um Untersuchungen mit osmotisch wirksamen Kristalloiden, so gelingt es unter geeigneten Verhältnissen, nach der Endosmose auch eine Exosmose zu beobachten.

Unter den kurz als „Permeabilitätsversuche" bezeichneten Experimenten nehmen die Endosmoseversuche von osmotisch wirksamen Kristalloiden in künstlichem Milieu bei Fehlen von Energieaufwand den größten Raum ein. Die folgenden Zeilen beziehen sich allein auf solche Versuche, die, ausgeführt mit Anelektrolyten, durch die Verwendung einer vor kurzem beschriebenen Durchströmungskammer (Stadelmann 1951 b) besser auswertbare Resultate geben.

2. Die physikalischen Grundlagen des Versuchsablaufes und die Ausgangsgleichung für ein Permeabilitätsmaß.

Für die Untersuchung der Permeabilität ist ein Vergleich des Permeationsvermögens sowohl derselben Zelle für verschiedene Substanzen als auch von verschiedenen Zellen für gleiche Substanzen von großem Interesse. Um einen solchen quantitativ durchzuführen, ist ein Maß zu definieren, welches die Größe dieser Eigenschaft zahlenmäßig angibt und für den Vergleich verschiedener Zellen auch unabhängig von den Versuchsverhältnissen und der Zellgröße ist. Einfache Permeabilitätsmaße, die sich unmittelbar aus den im Versuch merkbaren Veränderungen ableiten, sind allein zu beschränkten Vergleichen zuzulassen, da die kausalen Zusammenhänge des Versuchsgeschehens nicht oder nur unvollständig berücksichtigt sind, was bei ausgedehnter Anwendung zu größeren Fehlern Anlaß geben kann.

Zur Festsetzung allgemein anwendbarer Maße geht man von einer bestimmten Grundannahme aus, welche die kausalen Zusammenhänge beim betrachteten Versuch wiedergibt, und formuliert diese durch eine mathematische Gleichung. Ist eine solche Ausgangsgleichung, wie meistens, eine Differentialgleichung mit mehreren Variablen, so wird man versuchen, sie durch geeignete Substitutionen der Variablen integrierbar zu machen. Man strebt dabei Größen einzuführen, die im Versuch gemessen werden. Nach der Integration ist die Gleichung für die Ausrechnung des gesuchten Maßes und, falls nötig, zum Einsetzen der im Versuch meßbaren Größen umzuformen. Ist eine Integration nicht möglich oder genügen erste Näherungswerte, so kann man durch Endlichwerden der Differentiale die Ausgangsformel unmittelbar auswerten; man gelangt so aber meist nur zu ungenaueren Resultaten.

Maße für die Stoffpermeabilität des Protoplasten als Permeabilitätskonstanten oder Permeabilitätsfaktoren bezeichnet, wurden bereits von mehreren Autoren definiert und deren Ausrechnung gezeigt. Hiebei sind Bestimmungsmethoden, in welchen das osmotische Verhalten der Zelle ausgewertet wird. allen anderen an Bedeutung und Umfang ihrer Anwendbarkeit weit überlegen.

Die ersten Rückdehnungen des plasmolysierten Protoplasten wurden von Klebs (1887 a, 1887 b p. 187) und de Vries (1888, 1889) beschrieben. Lepeschkin (1908 b) gibt zwei Methoden zur Messung der Protoplastenpermeabilität an. In der „Methode der isotonischen Koeffizienten" (vgl. Lepeschkin 1938) wird das Verhältnis der isotonischen Koeffizienten von Zucker (als impermeabler Substanz) und der zu untersuchenden Substanz an Plasmolyseversuchen bestimmt. Permeiert diese Substanz in die Vakuole, so weicht das Verhältnis von einem nach physikalisch-chemischen Methoden gefundenen Wert ab. Aus dieser Abweichung ermittelt Lepeschkin einen Faktor, welcher dem eigentlichen Permeabilitätsmaß proportional sein soll. In einer zweiten Bestimmungsmethode (Plasmolytische Methode) wird dieses Maß aus der Rückdehnung des Protoplasten in einer hypertonischen Lösung des Diosmotikum errechnet, indem von der während einer bestimmten Zeit eingedrungenen Substanzmenge, der mittleren Protoplastenoberfläche und dem mittleren Konzentrationsabfall ausgegangen wird. Nach der verfeinerten „grenzplasmolytischen Methode" von Fitting (1915) benutzt man eine größere Zahl möglichst gleichwertiger Schnitte mit Zellen. die denselben osmotischen Wert besitzen und Lösungen mit fein abgestuften Konzentrationen des Diosmotikum. In jede der Lösungen werden einzelne Schnitte möglichst gleichzeitig eingelegt und nach einer gewissen Zeit die plasmolytische Grenzkonzentration bestimmt. Bei den Schnitten die in hypertonischen Konzentrationen liegen, geht die Plasmolyse durch die Endosmose mit der Zeit zurück und Fitting definiert als Maß für die Menge der eingedrungenen Substanz die Differenz zwischen den plasmolytischen Grenzkonzentrationen zu Beginn und am Ende des betrachteten Zeitintervalls. Während dieses Permeabilitätsmaß als Mittelwert der Zellen eines Schnittes berechnet wird, mißt Höfler (1918 a) erstmalig die Protoplastenpermeabilität der einzelnen Zelle, indem er aus den Versuchszeiten und den Messungen der Plasmolysegrade (Höfler 1917, 1918 b) einen „Stundenwert der eindringenden Lösungsmenge" exakt errechnet; später (Höfler und Weber 1926, p. 651) wird auch auf die Berücksichtigung des Konzentrationsgefälles der diosmierenden Substanz hingewiesen. Ruhland und Hoffmann (1925) ermitteln einen isotonischen Koeffizienten nach einer ähnlichen Methode wie Fitting als Permeabilitätsmaß, indem sie bei *Beggiatoa mirabilis* statt einer Grenzplasmolyse die Knickungen der Membran als Kriterium für die Isotonie heranziehen. Diese Knickungen entstehen beim Einlegen der Fäden in eine osmotisch wirksame Lösung, da sich der Protoplast von der Zellwand nicht ablöst H. Bärlund (1929) benützt zur Darstellung der Verhältnisse eines Permeabilitätsversuches das Ficksche Gesetz, welches er in vereinfachter Form einführt und unmittelbar integriert. In einer späteren Arbeit untersuchen Collander und Bärlund (1933) die Anwendbarkeit dieser Gleichung und leiten als Permeabilitätsmaß einen P'-Wert für die Protoplastenpermeabilität ab. der nachträglich durch die Berücksichtigung der mit einem konstanten Mittelwert eingesetzten Protoplastenoberfläche zu einem „P-Wert" für die Protoplasma-Permeabilität umgerechnet wird (vergleiche auch Höfler 1934,

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

p. 233, Elo, 1939) Zur Auswertung der Formel muß neben der Gleichgewichtskonzentration auch die Konzentration des permeierenden Stoffes im Zellsaft im betracheten Zeitpunkt gemessen werden. Jacobs und Stewart (1932) leiten aus dem Fickschen Gesetz durch Integration eine Gleichung für ein auf die Oberflächeneinheit reduziertes Permeabilitätsmaß ab. Zelloberfläche und Volumen werden als Konstante angesehen und Mittelwerte eingeführt. Durch eine zweite Gleichung wird die bis zur Erreichung des Minimalvolumens des Zellsaftraumes eingedrungene Stoffmenge ermittelt und mit diesem Wert und der Außenkonzentration das Permeabilitätsmaß errechnet. Die aus den Vereinfachungen entstehenden Fehler betragen für ihre Untersuchungen an Seeigeleiern etwa zehn Prozent. Höfler (1934) berechnet aus den Plasmolysegraden einen Wert für das Konzentrationsgefälle und zeigt mit diesem und dem Stundenwert der eindringenden Lösungsmenge im Sinne der Formel von Collander und Bärlund die Berechnung der „Protoplastenpermeabilität P'" und der „Protoplasmapermeabilität P". Ashida (zit. in Hofmeister 1938, vgl. Kreuz 1941, p. 4, Rottenburg 1943, p. 232) ermittelt hiezu noch eine Korrektur für die genauere Berechnung des Konzentrationsgefälles. Resühr (1935) integriert die Formel von Collander und Bärlund für einen Permeabilitätsversuch nach der Partialmethode (Hofmeister 1935) indem er die Zusammenhänge zwischen Konzentration, osmotischem Partialdruck und Volumen des Zellsaftraumes ableitet und den Anfangswert der Protoplastenoberfläche, die er als konstant betrachtet, in die Endformel einsetzt.

Scarth (1939) geht von der zeitlichen Volumsänderung der Vakuole aus und gelangt für langsam eindringende Substanzen schließlich zur Fickschen Diffusionsformel. Die Protoplastenoberfläche und die Konzentrationdifferenz werden durch das Vakuolenvolumen als einzige abhängige Variable ausgedrückt. Dadurch läßt sich die Gleichung integrieren und liefert ein Permeabilitätsmaß für Zellen mit meßbarem Volumen. Bei schnell eindringenden Substanzen nimmt Scarth ein osmotisches Ungleichgewicht zwischen Außenlösung und Zellsaft an und errechnet eine einfache Gleichung für den Permeabilitätsfaktor.

Für die Wasserpermeabilität war die Integration einer Differentialgleichung früher durchgeführt worden (Jacobs 1927; Höfler 1930; Huber und Höfler 1930; Levitt-Scarth-Gibbs 1936). Die Bestimmung der Wasser- und Stoffpermeabilität in einem Versuch wird von Jacobs (1932) und Frey-Wyssling (1945, 1946) beschrieben. Jacobs benutzt eine halbgraphische Methode und Frey-Wyssling versucht durch die Einführung der „Wasserkonzentration" auch die Wasserpermeation als Diffusion aufzufassen, wodurch das gegensinnige Zusammenwirken zwischen Stoffpermeation und Wasserpermeation beim Versuchsablauf auswertbar wird. Frey-Wyssling und Bochsler (1947) führen diese Betrachtungen weiter und Bochsler (1948) gelangt durch Integration zu neuen Gleichungen für die Wasserpermeabilität mit oder ohne gleichzeitiger Endosmose.

Von diesen verschiedenartigen Maßen der Stoffpermeabilität aus osmotischen Bestimmungsmethoden entsprechen der eingangs (p. 762) gestellten Forderung für die Art ihrer Ableitung nur jene, die sich vom Fickschen Gesetz ableiten. Die Ausgangsgleichung wird zur Integration aber meist vereinfacht, indem willkürlich die

Protoplastenoberfläche oder das Vakuolenvolumen als konstant angenommen (Bärlund 1929, Jacobs und Stewart 1932, p. 78, Collander und Bärlund 1933, p. 26; Protoplastenoberfläche allein bei Resühr 1935, p. 437) und ihr Mittelwert in die Endgleichung eingesetzt wird, obwohl die Änderungen dieser Größen während des Versuches für seinen Ablauf mitbestimmend sind. Frey-Wyssling (1945 f.) umgeht solche Vernachlässigungen, bezieht aber sein Permeabilitätsmaß auf die Oberflächenentwicklung eins und Scarth (1939) zeigt die Integration der Ausgangsgleichung ohne solche Vereinfachungen, vernachlässigt aber in der Endformel ein Glied, das den Wert des Permeabilitätsfaktors scheinbar nur wenig verändert.

In der hier zu zeigenden Ableitung sollen diese Vereinfachungen vermieden werden und das Permeabilitätsmaß aus den im Versuch zugänglichen Werten leicht zu berechnen sein. Es unterliegt in seiner Anwendbarkeit bestimmten Voraussetzungen und Einschränkungen, die zu präzisieren sind (vgl. Stadelmann 1951a, p. 131). Die experimentelle Prüfung im Versuch bleibt dem zweiten Teil der Arbeit überlassen.

Als Grundannahme für das Permeabilitätsgeschehen soll auch hier vom Fickschen Diffusionsgesetz ausgegangen werden[1]. Einem allgemeinen Ausgleichsgesetz (Eggert 1948) dem von Fick (1855) die Diffusion unterstellt wurde. Noyes und Whitney (1897) benutzten es für Betrachtungen über die Auflösungsgeschwindigkeit fester Stoffe in ihren Lösungen. Brunner (1904) zog es zu seinen Untersuchungen über Reaktionsgeschwindigkeiten heran und Sebor (1904) führte es in seine Betrachtungen über die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser durch semipermeable Membranen ein. Runnström (1911) verwendete es für die Berechnung der Permeabilität des Seeigeleies für Farbstoffe und Bärlund (1929) zur Bestimmung der Protoplastenpermeabilität pflanzlicher Zellen.

Das Ficksche Gesetz lautet: $\frac{dm}{dt} = -D \cdot q \cdot \frac{dc}{dx}$, worin D der Diffusionskoeffizient, dc das an der Strecke dx wirksame Konzentrationsgefälle, q der Querschnitt der Diffusionsfläche und dm die durch diese diffundierende Stoffmenge ist. Da es sich hier nicht um ein Konzentrationsgefälle innerhalb desselben Mediums handelt, sondern um Konzentrationsdifferenzen zu beiden Seiten eines dünnen Protoplasmamantels, wird an Stelle von dc der Ausdruck C—k

[1] Es ließen sich auch andere Ausgangsannahmen postulieren. Ihre Richtigkeit kann über die aus dem jeweils resultierenden Permeabilitätsmaß ableitbaren Folgerungen (vgl. deren Ableitung für das hier gezeigte Maß p. 779 f.) experimentell überprüft werden.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

eingeführt. Dabei kann man stets annehmen, daß das Endgleichgewicht erreicht ist, wenn die Konzentration k des Diosmotikum in der Vakuole durch die Endomose auf den Wert C der Außenlösung ansteigt (vgl. Collander und Bärlund 1933, p. 34). Statt dx wird die als konstant angenommene Dicke x gesetzt und schließlich für den Quotienten $-\frac{D}{x}$ der neue Faktor K, das Permeabilitätsmaß, eingeführt, so daß die bereits mehrfach benutzte Ausgangsgleichung (vgl. Bärlund 1929, Collander und Bärlund 1933, p. 25; Resühr 1935, p. 441 u. a.) folgt:

$$\frac{dm}{dt} = K \cdot q \cdot (C - k). \tag{1}$$

Darin bedeutet:

q die Protoplastenoberfläche in cm^2;
m die permeierende Substanzmenge in mol;
k die Konzentration der permeierenden Substanz in der Vakuole in mol/ccm;
C die Konzentration der permeierenden Substanz in der Außenlösung in mol/ccm;
t die Zeit in Sekunden;
K den Proportionalitätsfaktor, als Permeabilitätsmaß oder Permeabilitätsfaktor bezeichnet, in cm/sec.

Das Vorzeichen von K wechselt mit der Permeationsrichtung des Diosmotikum. Die Längen und Zeiten werden im CGS-System, in cm und sec., die Mengen aber nicht in Gramm-Massen, sondern in mol angegeben. Ob bei der Berechnung der Konzentration als Volumen dasjenige der Lösung oder das des Lösungsmittels vor Zugabe des aufzulösenden Stoffes eingesetzt wird (Renner 1912), ist für die hier vorkommenden Konzentrationen und Genauigkeiten meist ohne Bedeutung.

Formel (1) besagt, daß die aus dem Wert des Differentialquotienten ableitbare, pro Zeiteinheit durchtretende Stoffmenge proportional ist der Protoplastenoberfläche und der momentanen Konzentrationsdifferenz zwischen Vakuole und Außenlösung. Durch die Form der Differentialgleichung sind die stetigen Veränderungen aller Variablen berücksichtigt und der Faktor K ist ein absolutes Maß für die Stoffpermeabilität, sofern keine störenden Einflüsse den Versuchsablauf nach der postulierten Gesetzmäßigkeit verändern.

Bei der Berechnung wird von der Gültigkeit der folgenden physikalisch-chemischen Beziehungen ausgegangen:

a) Entsprechend dem Daltonschen Gesetz für Partialdrucke ist der osmotische Gesamtdruck bzw. die Gesamtkonzentration

einer Lösung stets die Summe aller osmotischen Partialdrucke bzw. Partialkonzentrationen der Lösung.

b) Nach dem Van't Hoffschen Gesetz und dem Boyle-Mariotteschen Gesetz ist bei konstanter Teilchenzahl des gelösten Stoffes sein osmotischer Druck in einer Lösung dem Lösungsvolumen umgekehrt proportional. Von den Van der Waalsschen Korrekturen wird abgesehen.

Störende Einflüsse bleiben vermieden und eine Berechnung von K ist durchführbar, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

c) Bei den benutzten Zellen kann die Plasmakorrektur (vgl. Höfler und Weber 1926, p. 652, Huber und Höfler 1930, p. 376), d. h. der Anteil des Protoplasmas am Gesamtvolumen des Protoplasten vernachlässigt werden und das Plasma ändert sein Quellungsvolumen während des Versuches nicht (Höfler 1920, p. 292)[2].

d) Die Konzentration der Außenlösung bleibt während des ganzen Versuches in allen ihren Volumselementen unverändert. Dies gilt besonders für die dem Protoplasten unmittelbar angrenzende Flüssigkeitsschicht in bezug auf den übrigen Teil der Außenlösung (Bärlund 1929, Jacobs und Stewart 1932, p. 73; Resühr 1935, p. 437).

e) Der Diffusionswiderstand innerhalb der Vakuole hat praktisch keinen Einfluß auf die Permeation des Diosmotikum in den Zellsaftraum (vgl. Collander und Bärlund 1923, p. 33). Es besteht daher in allen Volumselementen des Zellsaftraumes zu gleichen Zeiten völlige Gleichheit der einzelnen Partialkonzentrationen für jeden darin gelösten Stoff (Jacobs und Stewart 1932, p. 74). Diese Annahme entspricht wohl den tatsächlichen Verhältnissen und der Einwand mangelnden Diffusionsausgleiches in der Vakuole (Bachmann 1939) ist hinfällig (vgl. Huber 1943, p. 442 f., Höfler 1949, p. 117).

f) Die Menge der in der Vakuole ursprünglich vorhandenen osmotisch wirksamen Substanz ändert sich während des Versuches nicht (keine Katatonose, Anatonose oder Exosmose, Bärlund 1929).

g) Die osmotische Wirksamkeit des Diosmotikum wird in der Vakuole weder vergrößert noch verringert (vgl. Höfler 1918 b, Bärlund 1929, Resühr 1935, p. 441).

h) Der Protoplast ist derart leicht beweglich, daß er eine Volumsänderung der Vakuole nicht verzögert und ihr keinen Widerstand entgegensetzt (Fitting 1915, p. 38, Bärlund 1929).

i) Der Protoplast ändert seine Permeabilitätseigenschaften im Laufe des Versuches nicht und wird durch die Außenlösung auch nicht derart angegriffen, daß solche Änderungen erfolgen.

j) Alle Oberflächenelemente des Protoplasten haben zu jedem Zeitpunkt gleiche Permeabilitätseigenschaften oder es sind deren Unterschiede vernachlässigbar klein. Insbesondere soll dies zwischen jenen Partien gelten, die der Zellwand anliegen und solchen, die zeitweise von dieser abgehoben sind (vgl. Höfler 1918 c, p. 440, Huber und Höfler 1930, p. 445).

[2] Dieser Hinweis ist notwendig, da manchmal einzelne Protoplasten auch in Harnstoff Aufquellung und Kappenplasmolyse zeigen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

k) Die Adhäsion des Protoplasten an der Membran ist nicht so groß, daß sich diese bei dessen Kontraktion eindellt.

l) Die Durchlässigkeit des Protoplasten für Wasser ist in beiden Richtungen um ein Mehrfaches größer als für das Diosmotikum (vgl. Resühr 1935, p. 440).

Da die Permeabilität temperaturabhängig ist (vgl. V. Ryssel-berghe 1901, Delf 1916, Stiles und Jörgensen 1917, Wartio-vaara 1942, 1949, Hirth 1942 und Seemann 1950, betreffend die Wasserpermeabilität) sowie von der Lichtintensität beeinflußt wird (Lepeschkin 1908a, Järvenkylä 1937), wofür noch keine allgemein gültigen Gesetzmäßigkeiten bekannt sind, muß man voraussetzen:

m) Versuche, die verglichen werden sollen, sind bei ähnlichen Temperatur- und Beleuchtungsverhältnissen auszuführen.

Bei der Diskussion der Druck- und Konzentrationsveränderungen während eines Permeabilitätsversuches wird die gegenseitige Abhängigkeit der osmotischen Zustandsgrößen als bekannt vorausgesetzt (vgl. Ursprung und Blum 1916, Höfler 1920, Ursprung 1926); sie wurde an anderer Stelle (Stadelmann 1951a, p. 26) ausführlich behandelt.

Gelangt eine turgeszente Zelle in eine osmotisch wirksame Lösung, so wird ihr Druckgleichgewicht gestört, da der osmotische Druck der Außenlösung dem der Vakuole entgegenwirkt. Enthält die Außenlösung ein Diosmotikum, so besteht für dieses ein Konzentrationsgefälle zur Vakuole hin, da dort ihre Konzentration am Versuchsbeginn null ist. Der Versuchsablauf ist dann auf die Herstellung des Konzentrationsgleichgewichtes und des osmotischen Druckgleichgewichtes ausgerichtet. Die Schnelligkeit, mit welcher das Druckgleichgewicht erreicht wird, hängt vom Permeationswiderstand des Protoplasmas für Wasser ab. Es kann sich ja allein der osmotische Druck der Vakuole ändern (wenn man vom Wanddruck absieht, der bei genügender Hypertonie der Außenlösung nicht wesentlich mitwirkt), was durch einen Wasseraustritt aus der Vakuole erfolgt. Die Schnelligkeit, mit welcher die permeierende Substanz aus der Außenlösung in die Vakuole eindringt, ist von der Größe des Permeationswiderstandes des Protoplasmas für das Diosmotikum abhängig. Bei gleichen Versuchsbedingungen läßt sich je nach dem Verhältnis der beiden Permeationswiderstände zueinander ein verschiedenartiger Verlauf erwarten. Ist das Protoplasma für ein Diosmotikum (z. B. Alkohol) relativ viel stärker permeabel als für Wasser, so wird erst am Versuchsende mit dem Konzentrationsgleichgewicht auch das osmotische Gleichgewicht erreicht. Ist umgekehrt die Durchlässigkeit für Wasser höher, so entsteht das osmotische Gleichgewicht vor dem Konzentrationsgleichgewicht des Diosmotikum und bleibt bis zum

Versuchsende, da ohne Energieaufwand kein neues Ungleichgewicht entsteht. Die folgenden Darlegungen gelten nur für diesen zweiten Fall, der bei den meisten Permeabilitätversuchen verifiziert ist.

Das Diosmotikum dringt unabhängig vom osmotischen Druckausgleich nach der Gesetzmäßigkeit der Formel (1) in die Vakuole ein, sobald die Zelle in der betreffenden Lösung liegt, und vergrößert die Gesamtmenge der osmotisch wirksamen Substanz. War die Menge der ursprünglich in der Vakuole vorhandenen Substanz m_u mol[3] und dringt bis zum Beginn des osmotischen Gleichgewichtes m_s mol des Diosmotikum in die Vakuole ein, so ist dann dort die Gesamtmenge: $m_o = m_u + m_s$. Ist V_o das Vakuolenvolumen zu dieser Zeit, so werden die betreffenden Konzentrationen: $c = \frac{m_u}{V_o}$, $k = \frac{m_s}{V_o}$; enthält die Außenlösung nur das Diosmotikum gelöst (Totalmethode des Permeabilitätsversuches im Gegensatz zur Partialmethode von Hofmeister [1935], deren Behandlung in einer späteren Arbeit erfolgt), so gilt wegen des osmotischen Gleichgewichtes:

$$C = c + k. \tag{2}$$

Darin bedeutet:

C Konzentration der Außenlösung in mol/ccm;

c Partialkonzentration der ursprünglich in der Vakuole vorhandenen osmotisch wirksamen Substanz in mol/ccm;

k Partialkonzentration der permeierenden Substanz im Zellsaftraum in mol/ccm.

Da c nie null sein kann, folgt aus dieser Gleichung, daß beim Eintritt des osmotischen Gleichgewichtes stets $C > k$ ist und folglich Substanz aus der Außenlösung weiterhin in die Vakuole diosmiert. Zur Erhaltung dieses Gleichgewichtes dringt die dem Diosmotikum entsprechende Wassermenge mit diesem ein und der Protoplast dehnt sich zurück. Die Gesamtkonzentration des Zellsaftes bleibt dabei gleich derjenigen der Außenlösung und die Partialkonzentration c verkleinert sich in jenem Maße als der Wert von k zunimmt. Ist dabei die Wasserpermeabilität des Protoplasmas nicht ausreichend hoch, so könnte die Eindringgeschwindigkeit des Diosmotikum herabgesetzt werden. Dieses würde dann nur so rasch ein-

[3] Diese Menge kann nur aus dem osmotischen Verhalten der Zelle erschlossen werden und errechnet sich in mol. Sie läßt sich nicht in Gramm ausdrücken, da verschiedenartige Substanzen in unbekannten Anteilen im Zellsaft gelöst sind. Die Mengenangabe in mol ist demnach, entsprechend den Grundvorstellungen über die Osmose, hier allein ein Maß für die Teilchenzahl.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

dringen, als die entsprechende Wassermenge in die Vakuole zu permeieren vermag. Da über die eindringende Substanzmenge die Berechnung von K erfolgt und sie demnach nur von den Größen der Gleichung (1) abhängen darf, muß die Voraussetzung (l) (vgl. p. 768) gelten.

Die Rückdehnung des Protoplasten, für deren Dauer die Gleichung (2) die Konzentrationsverhältnisse beschreibt, ist erst beendet, wenn die Zellwand einer Volumsvergrößerung entgegensteht. Bei weiterer Volumsdehnung wird wieder ein Wanddruck gegen den osmotischen Druck der Vakuole wirksam, der sich mit den osmotischen Drucken am Druckgleichgewicht beteiligt. Das Endgleichgewicht ist erreicht, wenn die Partialkonzentration k gleich ist der Außenkonzentration C, d. h. der Partialdruck des Diosmotikum in der Vakuole gleich ist dem Druck in der Außenlösung. Die Membran übt dann wieder den gleichen Wanddruck aus wie in reinem Wasser und die Gesamtkonzentration des Zellsaftes hat sich um die Konzentration der Außenlösung erhöht.

Den Ablauf eines Permeabilitätsversuches kann man demnach in vier Phasen unterteilen:

Die erste Phase, Anfangsphase, beginnt mit dem Einlegen der Zelle in die hypertonische Außenlösung und dauert bis zu jenem Zeitpunkt, bei welchem der Wanddruck der Zellmembran unwirksam wird und sich der Protoplast von der Wand löst.

Die zweite Phase, Kontraktionsphase, beginnt mit der Loslösung des Protoplasten von der Zellwand und endet mit dem Zustand maximaler Kontraktion der Vakuole, also mit der Einstellung des osmotischen Gleichgewichtes zwischen Zellsaftraum und Außenlösung.

Die dritte Phase, Rückdehnungsphase, beginnt mit der Einstellung des osmotischen Gleichgewichtes und endet mit der völligen Rückdehnung des Protoplasten, wobei dieser im Moment der Deplasmolyse der Zellwand noch so lose anliegt, daß kein Wanddruck entsteht.

Die vierte Phase, Endphase, beginnt mit dem Auftreten eines Wanddruckes gegenüber dem der Zellwand anliegenden Protoplasten und schließt mit dem Ende des Permeabilitätsversuches, wenn die Partialkonzentration des Diosmotikum in der Vakuole gleich der Außenkonzentration ist.

Meßbare Veränderungen an der Zelle sind innerhalb der Anfangs- und Endphase die der Zellwanddehnung (praktisch benutzt bei Schließ-

zellen, vgl. Reuter 1943, Stöger 1950), während der Kontraktions- und Rückdehnungsphase die des Protoplastenvolumens. Während sich aus der Kontraktionsphase die Größe der Wasserpermeabilität ergibt (vgl. Höfler 1930), können, wie zu zeigen sein wird, aus der Rückdehnungsphase die abhängigen Variablen der Formel (1) berechnet werden. Die Rückdehnungs- bzw. Kontraktionsphase ist um so kürzer, je schneller das Diosmotikum bzw. das Wasser eindringt und je schwächer hypertonisch die Außen ösung ist. Schließlich wird bei einem bestimmten unteren Wert dieser Faktoren die Einstellung des Druckg eichgewichtes so schnell erfolgen, daß es zu keiner Abhebung des Protoplasten von der Zellwand kommt. Umgekehrt wird bei genügender Hypertonie und langsamer Stoffpermeation wegen Voraussetzung (1) (vgl. p. 768) die Rückdehnungsphase wesentlich länger dauern als die Anfangs- und Kontraktionsphase.

Die graphische Darstellung dieser Verhältnisse ist in den Abb. 1—4 gezeigt, wobei der Kurvenverlauf entsprechend den obigen Darstellungen angenommen ist, da er sich experimentell nur für die Rückdehnungsphase bestimmen läßt.

Die Anfangs- und Kontraktionsphase ist in den Diagrammen stets relativ längerdauernd eingetragen, während die Endphase gegenüber der Rückdehnungsphase verkürzt wurde. In Wirklichkeit ist bei den üblichen Versuchen die Anfangs- und Kontraktionsphase sehr kurz und die Endphase wesentlich länger als dargestellt. Letztere dauert theoretisch unendlich lang[4], wie aus einer Überlegung nach Gleichung (1) hervorgeht Aus Gründen der Deutlichkeit wurden die Ordinaten teilweise stark überhöht, so daß die Kurven wohl ein richtiges Bild über die Art des Ablaufes geben, jedoch nicht immer das wahre Verhältnis der absoluten Größe einzelner Ordinaten oder Abszissen erkennen lassen. Vor Beginn der Anfangsphase sind die Verhältnisse dargestellt, die beim Einlegen der Zelle in reines Wasser bestehen.

3. Die Berechnung der permeierenden Stoffmenge, deren Partialkonzentration und der Protoplastenoberfläche.

Liegen die Zeiten t_1 und t_2 in der Rückdehnungsphase, so ergibt sich die zwischen diesen Zeiten eingedrungene Menge des Diosmotikum Dm_S aus der bis zur Zeit t_1 eingedrungenen Menge m_{S1} und der bis zur Zeit t_2 eingedrungenen Menge m_{S2} zu:

$$Dm_S = m_{S2} - m_{S1}.$$

[4] Ich danke an dieser Stelle Herrn Prof. H. Sirk (Wien) für seine freundliche Hilfe in mathematischen Fragen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

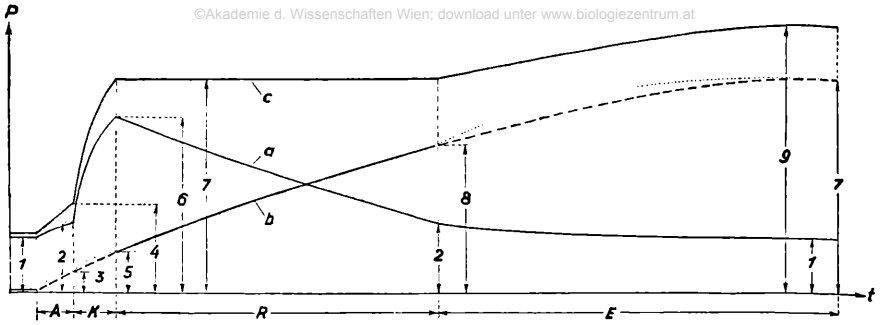

Abb. 1.

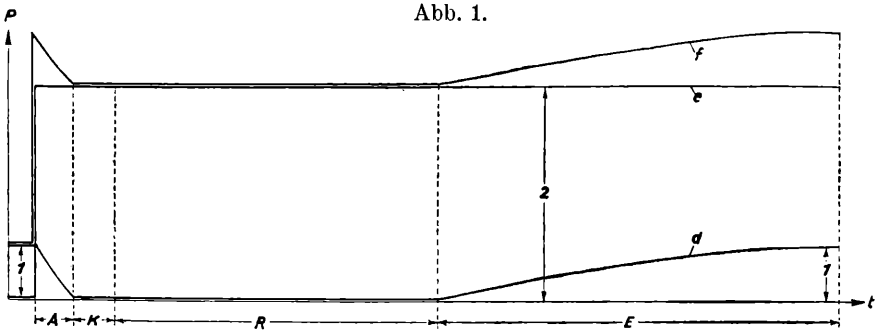

Abb. 2.

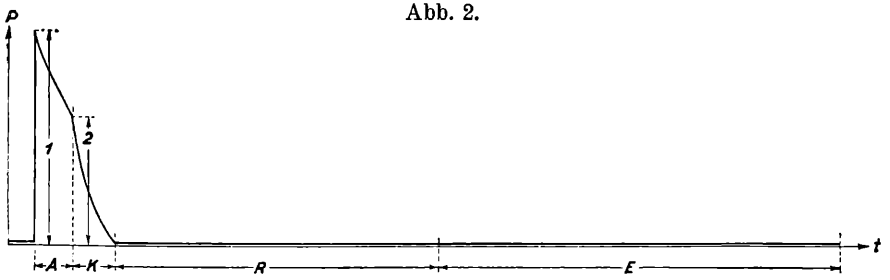

Abb. 3.

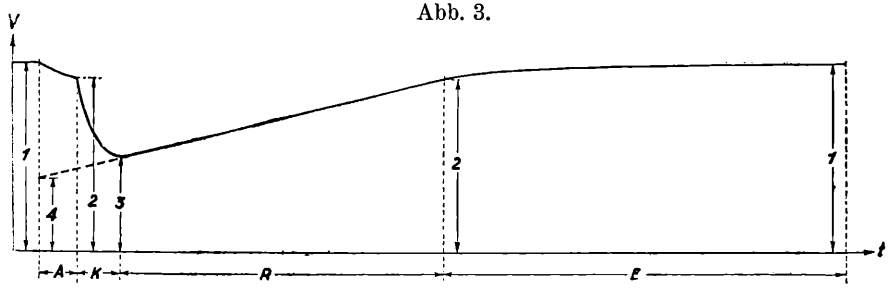

Abb. 4.

Abb. 1—4.

Darstellung des zeitlichen Verlaufes charakteristischer Größen eines typischen Permeabilitätsversuches (vgl. p. 768 ff.). Auf der Abzisse (Zeitachse) bedeuten: A = Anfangsphase; K = Kontraktionsphase; R = Rückdehnungsphase; E = Endphase.

Abb. 1. Ordinate: Drucke, die auf eine Vergrößerung der Vakuole hinwirken; da hier nur osmotische (Partial-) Drucke vorkommen, die ihren Konzentrationen proportional sind, werden gleichzeitig auch die Konzentrationsverhältnisse dargestellt. Kurve a: Osmotischer Druck (oD) des Zellsaftes; Kurve b: oD des permeierten Diosmotikum in der Vakuole[1]; Kurve c: Summe der Kurven a und b = Gesamtkomponente der auf eine Vergrößerung der Vakuole hinwirkenden Drucke. Die Zahlen bedeuten: 1 oD der ursprünglich im Zellsaft gelösten osmotisch wirksamen Substanz in der turgeszenten Zelle; 2 osmotischer Partialdruck (oPD) der ursprünglich vorhandenen Substanz am Beginn der Kontraktionsphase; 3 oPD der permeierten Substanz in der Vakuole am Beginn der Kontraktionsphase; 4 osmotischer Gesamtdruck (oGD) in der Vakuole am Beginn der Kontraktionsphase; 5 oPD der permeierten Substanz in der Vakuole am Beginn der Rückdehnungsphase; 6 oPD der ursprünglich vorhandenen Substanz am Beginn der Rückdehnungsphase; 7 oGD in der Vakuole während der Rückdehnungsphase = oPD der diosmierten Substanz am Schluß der Endphase; 8 oPD der permeierten Substanz am Beginn der Endphase; 9 oGD in der Vakuole am Schluß der Endphase.

Abb. 2. Ordinate: Drucke die auf eine Verkleinerung der Vakuole hinwirken; Kurve d: Wanddruck der Zellmembran; Kurve e: osmotischer Druck der Außenlösung; Kurve f: Summe der Kurven d und e = Gesamtkomponente der auf eine Verkleinerung der Vakuole hinwirkenden Drucke. 1 Wanddruck in der turgeszenten Zelle; 2 oD der diosmierenden Außenlösung.

Abb. 3. Ordinate: Druck der auf eine Verkleinerung der Vakuole hinwirkt; Kurve = Kurve f—Kurve c: Resultierender Gesamtdruck; 1 oD des Diosmotikum in der Außenlösung; 2 Druckdifferenz zwischen dem oD der Außenlösung und dem oGD in der Vakuole am Beginn der Kontraktionsphase.

Abb. 4. Ordinate: Vakuolenvolumen (Vv); 1 Vv der turgeszenten Zelle; 2 Vv am Beginn der Kontraktionsphase = Vv am Ende der Rückdehnungsphase (= Vv bei Grenzplasmolyse); 3 Vv am Ende der Kontraktionsphase; 4 für den Beginn des Permeabilitätsversuches aus dem Rückdehnungsverlauf extrapoliertes Vv.

Es bleibt unentschieden, ob die Kurve b an den Grenzen der einzelnen Phasen stetig verläuft (strichliert) oder unstetig ist (punktiert). Für die Kurve c wurde willkürlich der stetige Verlauf angenommen. Sie läßt sich analog auch für den unstetigen Verlauf konstruieren.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Man geht von der Gleichung (2), welche bei beiden Zeiten gilt, aus und bekommt:

$$C = c_1 + k_1; \qquad C = c_2 + k_2.$$

Nach Voraussetzung (f) und (g) (vgl. p. 767) gilt für die Menge der ursprünglich vorhandenen Substanz m_u:

$$m_u = V_1 \cdot c_1 = V_2 \cdot c_2,$$

worin V_1 und V_2 die Vakuolenvolumina bedeuten.

Analog gilt für die Mengen m_{s1} und m_{s2}:

$$m_{s1} = V_1 \cdot k_1; \qquad m_{s2} = V_2 \cdot k_2.$$

Berechnet man hieraus die Konzentrationen und führt sie in die ersten beiden Gleichungen ein, so folgt:

$$C = \frac{m_u}{V_1} + \frac{m_{s1}}{V_1}; \qquad C = \frac{m_u}{V_2} + \frac{m_{s2}}{V_2},$$

und umgeformt:

$$V_1 \cdot C = m_u + m_{s1}; \qquad V_2 \cdot C = m_u + m_{s2}.$$

Durch Subtraktion erhält man schließlich:

$$Dm_s = m_{s2} - m_{s1} = C \cdot (V_2 - V_1).$$ [5]

Die zwischen den Zeiten 1 und 2 in der Rückdehnungsphase eingedrungene Menge des Diosmotikum ergibt sich also aus der bekannten Außenkonzentration und aus der Messung zweier Vakuolenvolumina. Das Vakuolenvolumen kann aus den im mikroskopischen Bild ersichtlichen Abgrenzungen des Protoplasten nur dann bestimmt werden, wenn dieser eine einfache geometrische Gestalt besitzt und die Protoplasmakorrektur (vgl. p. 767) vernachlässigt werden kann. Benützt man zu den Versuchen langgestreckte zylindrische Zellen, so nimmt der Protoplast im Laufe der Rückdehnung bekanntlich die Gestalt eines Zylinders mit zwei halbkugeligen Kuppen an (Form der „Endplasmolyse" vgl. Höfler 1918 b, S. 137), und es läßt sich das Volumen nach Höfler (1917) aus einer Messung der Protoplastenlänge L und der Zellbreite b sehr einfach bestimmen (vgl. Abb. 5). In diesem Fall können auch die anderen abhängigen Variablen der Gleichung (1) durch einen Ausdruck ersetzt werden, der neben Konstanten die Protoplastenlänge L als einzige Variable enthält, so daß die Ausgangsgleichung

[5] Lepeschkin (1908 b, p. 209) benutzte als erster diese Formel zur Bestimmung einer endosmierten Glyzerinmenge.

integrierbar wird, ohne daß, wie bisher üblich, im Berechnungsgang von K Variable als Konstante behandelt werden.

Nach Höfler folgt für das Vakuolenvolumen bei Endplasmolyse:

$$V = \frac{\pi \ b^2}{4} \cdot \left(L - \frac{b}{3}\right).$$

Es wird demnach:

$$Dm_S = \frac{\pi \cdot b^2}{4} \cdot C \cdot (L_2 - L_1). \qquad (3)$$

Darin bedeutet:

b innere Zellbreite in cm;
C Konzentration des Diosmotikum in der Außenlösung in mol/ccm;
L_1 Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe zur Zeit t_1 in cm;
L_2 Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe zur Zeit t_2 in cm;
Dm_S die zwischen den Zeiten t_1 und t_2 eingedrungene Menge des Diosmotikum in mol.

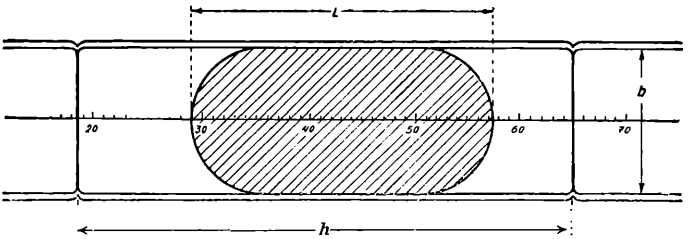

Abb. 5. Schema einer zylindrischen Zelle im Zustand der Endplasmolyse. L = Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe; b = innere Zellbreite; h = Zellänge.

Durch die Beschränkung auf zylindrische Zellen und auf den Zustand der Endplasmolyse wird die experimentelle Anwendbarkeit dieser Bestimmungsmethode in demselben Maße begrenzt. wie es bei einigen anderen Permeabilitätsmaßen bereits der Fall ist (vgl. Höfler 1918a, 1934; Resühr 1935; Frey-Wyssling 1945f.; Bochsler 1948). Für die Versuchsauswertung geht außerdem noch ein kleiner Abschnitt am Beginn und am Ende der Rückdehnungsphase verloren, da die Form der Endplasmolyse bei den meisten Zellobjekten am Beginn der Rückdehnungsphase noch nicht erreicht ist[6] und andererseits bei fortschreitender Rückdehnung, sobald die Plasmakuppen die Zellwand berühren und deformiert werden. sich das Vakuolenvolumen nicht mehr aus einer Messung allein der Protoplastenlängen bestimmen läßt.

[6] Auszunehmen sind z. B. die von Höfler (1930) und Huber und Höfler (1930) bei ihren Untersuchungen der Wasserpermeabilität verwendeten Objekte (Salvinia, Majanthemum u. a.), bei denen der Protoplast schon in der Kontraktionsphase die Form der Endplasmolyse zeigt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Partialkonzentration k des Diosmotikum in der Vakuole ist nach Gleichung (2):

$$k = C - c.$$

Es muß also der Wert für die Partialkonzentration c der ursprünglich vorhandenen Substanz bekannt sein. Wegen der Voraussetzungen (f) und (g) gilt dabei die einfache Volums-Konzentrationsbeziehung $c = \frac{m_u}{V}$, so daß c immer berechnet werden kann, wenn m_u bekannt ist: Die Ermittlung der Konzentration c reduziert sich also auf eine Bestimmung der Menge m_u[7]. Im folgenden werden hiefür zwei Bestimmungsmethoden gezeigt, die im zweiten Teil dieser Arbeit bei ihrer experimentellen Anwendung zu diskutieren sind.

Bei der ersten Methode wird eine getrennte Vorplasmolyse in einer nicht diosmierenden Außenlösung ausgewertet. Es wird dort die perfekte Plasmolyse abgewartet und das Protoplastenvolumen berechnet. Wegen der Konzentrationsgleichheit zwischen Außenlösung und Vakuole gilt dann die einfache Beziehung: $m_u = C \cdot V_0$, wobei C die Konzentration der nicht-diosmierenden Außenlösung und V_0 das Vakuolenvolumen bei osmotischem Gleichgewicht ist.

In der zweiten Methode, einer Extrapolationsmethode, wird der zeitliche Verlauf der Rückdehnung, der durch die Anwendung einer Durchströmungskammer (Stadelmann 1951b) auch über einen längeren Zeitraum sehr genau protokolliert werden kann, in ein Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm eingetragen und dort bis zum Beginn des Permeabilitätsversuches extrapoliert. Dies ist möglich, da die Rückdehnung an ungeschädigten Zellen in der Regel stetig ist. Wie weit diese Stetigkeit in der Tat verifiziert ist, wird im zweiten Teil dieser Arbeit behandelt. Man nimmt nun an, daß dieser extrapolierte Wert für L_0 (vgl. Abb. 4, Größe 4) aus einem Plasmolyseversuch in isotonischer nicht-diosmierender Außenlösung stammt und berechnet über V_0 den Wert für m_u. Zu orientierenden Versuchen mag es auch genügen, den ersten meßbaren Wert von L als L_0 einzusetzen.

Während bei der einen Methode die Möglichkeit besteht, daß durch die Vorplasmolyse die Permeabilitätseigenschaften der Zelle verändert werden (vgl. Huber und Schmidt 1933) oder gegebenenfalls auf osmotische Koeffizienten (vgl. Fitting 1919) Rücksicht zu nehmen wäre, entstehen bei der zweiten Methode Fehler aus der Größe der Protoplastenoberfläche: Da während der

Trotzdem m_u nur die Gesamtteilchenzahl (vgl. p. 769) angibt, bringt diese Größe keine weiteren Ungenauigkeiten in den Berechnungsgang, da sie aus direkt meßbaren Größen bestimmt wird.

Anfangs- und Rückdehnungsphase diese Oberfläche stets größer ist, als die dem extrapolierten Wert zugehörige (die für die Form der Endplasmolyse gilt), wird auch die während dieser Phasen eindringende Menge des Diosmotikum etwas größer sein, als es der bei der Extrapolation angenommenen Form der Endplamolyse entspricht.

Mit dem nach einer dieser beiden Methoden bestimmten Wert von L_0 wird m_u aus der Gleichung $m_u = C \cdot V_0$ mit der Formel für das Vakuolenvolumen (vgl. p. 775) errechnet:

$$m_u = C \cdot \left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot \pi \cdot \frac{b^2}{4}. \tag{4}$$

Darin bedeutet:

m_u Menge der ursprünglich in der Vakuole vorhandenen osmotisch wirksamen Substanz in mol;
C Konzentration der Außenlösung in mol/ccm;
L_0 Die nach einer der beiden Methoden für einen Plasmolyseversuch in isotonischer Außenlösung ermittelte Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe in cm;
b innere Zellbreite in cm.

Setzt man diesen Wert nach Seite 776 für die Berechnung der Partialkonzentration c der ursprünglich vorhandenen Substanz in die Gleichung $c = \frac{m_u}{V}$ ein, so folgt:

$$c = C \cdot \frac{L_0 - \frac{b}{3}}{L - \frac{b}{3}}.$$

Diesen Wert in die Gleichung $k = C - c$ eingesetzt, folgt schließlich:

$$k = C \cdot \left(1 - \frac{L_0 - \frac{b}{3}}{L - \frac{b}{3}}\right). \tag{5}$$

Darin bedeutet:

k Partialkonzentration der diosmierenden Substanz im betrachteten Zeitpunkt in mol/ccm;
C Konzentration der Außenlösung in mol/ccm;
b innere Zellbreite in cm;
L Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe im betrachteten Zeitpunkt in cm.

Die Protoplastenoberfläche q läßt sich bei der Form der Endplasmolyse zerlegen in die Oberfläche eines Zylindermantels und zweier Halbkugeln. Hiefür hat Schmidt (1936) die Formel errechnet:

$$q = \pi \cdot b \cdot L. \tag{6}$$

Darin bedeutet:

L, b wie oben;
q Protoplastenoberfläche in cm^2.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

4. Die Endformel für das Permeabilitätsmaß.

Nachdem im vorigen Kapitel gezeigt wurde, wie unter gewissen Voraussetzungen und Einschränkungen (vgl. p. 766—768) die permeierende Stoffmenge Dm_S, die Partialkonzentration k und die Protoplastenoberfläche q aus den im Versuch meßbaren Größen (Außenkonzentration, Protoplastenlänge, Zellbreite) berechnet wird, ist es möglich, die Ausgangsgleichung (1) zu integrieren und den Faktor K zu berechnen:

Die Gleichung (1) lautet zunächst: $\frac{dm}{dt} = K \cdot q \cdot (C - k)$; Aus Gleichung (3) ergibt sich durch Unendlichkleinwerden der Differenzen:

$$dm_S = dm = \frac{b^2}{4} \cdot \pi \cdot C \cdot dL.$$

Führt man diesen Ausdruck und die Werte für k und q aus Gleichung (5) und (6) in die Gleichung (1) ein, so folgt zunächst:

$$\frac{dL}{dt} \cdot \pi \cdot \frac{b^2}{4} \cdot C = K \cdot \pi \cdot b \cdot L \cdot \left[C - C \cdot \left(1 - \frac{L_0 - \frac{b}{3}}{L - \frac{b}{3}} \right) \right].$$

Nach Trennung der Variablen schließlich:

$$dL - \frac{b}{3} \cdot \frac{dL}{L} = K \ \frac{4}{b} \cdot \left(L_0 - \frac{b}{3} \right) \cdot dt,$$

man integriert nun zwischen den Grenzen 1 und 2, welche beide in der Rückdehnungsphase liegen, und erhält:

$$L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot (\ln L_2 - \ln L_1) = K \cdot \frac{4}{b} \cdot \left(L_0 - \frac{b}{3} \right) \cdot (t_2 - t_1).$$

Dies liefert nach K aufgelöst die Endgleichung:

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}}{\left(L_0 - \frac{b}{3} \right) \cdot (t_2 - t_1)}. \qquad (7)$$

Darin bedeutet:

b innere Zellbreite in cm;
L_0 die nach einer der beiden Methoden für einen Plasmolyseversuch in isotonischer Außenlösung ermittelte Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe in cm;
L_1 Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe zur Zeit t_1 in cm;
L_2 Länge des Protoplasten von Kuppe zu Kuppe zur Zeit t_2 in cm;
t_1 und t_2 die Zeiten der Messung in sec;
K Proportionalitätsfaktor mit dem die Größe der Protoplastenpermeabilität gemessen wird in cm/sec.

Scarth (1939, p. 139, Formel 22) hat als erster eine vereinfachte Form dieser Gleichung errechnet, indem er das letzte Glied des Zählers vernachlässigt. (Über die Zulässigkeit dieser Vernachlässigung vgl. p. 782). L_0 wird dabei aus dem Beginn der Rückdehnungsphase bestimmt, so daß diese Endformel in jenen Versuchen anwendbar ist, bei welchen die bis zur ersten Messung von L eingedrungene Menge des Diosmotikum vernachlässigbar klein bleibt. Scarth führt seinen Berechnungsgang über das Vakuolenvolumen als einzige Variable und benutzt keine Gleichungen für die Partialkonzentrationen und die eingedrungene Stoffmenge.

Die Berechnung des Permeabilitätsmaßes K aus Versuchsergebnissen wird im zweiten Teil dieser Arbeit gezeigt. Mit der Gleichung (7) läßt sich noch die Richtigkeit der Ausgangsgleichung und ihrer Ableitung experimentell prüfen, da aus dem Zusammenhang der Meßgrößen L, t und b in der Formel (7) bestimmte Aussagen über die Art des Rückdehnungsverlaufes folgen. Werden diese durch den Versuch bestätigt, kann man mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schließen, daß die Endgleichung richtig ist. Findet man Abweichungen zwischen der Art der Rückdehnung, die aus Gleichung (7) folgt und der experimentell gefundenen, so zeigt dies auf Fehler in den Grundvorstellungen oder in der Ableitung.

Die erste Aussage betrifft den Rückdehnungsverlauf selbst. Er läßt sich aus einer Darstellung der Rückdehnungskurve erkennen, indem man für willkürlich gewählte Werte der Konstanten K, b und L_0 für eine Reihe von angenommenen L-Werten die zugehörigen Zeiten t berechnet und in einem Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm analog Abb. 4 einträgt. Hiebei ist es zweckmäßig, diese Funktion so zu bestimmen, daß sie unabhängig von den sich bei den einzelnen Versuchen ändernden Werten der obigen Konstanten dargestellt ist.

Man geht von der durch eine unbestimmte Integration folgenden Gleichung aus, die sich aus Formel (7) ergibt, wenn man dort $L_1 = L_0$, $L_2 = L$, $t_1 = 0$ und $t_2 = t$ setzt:

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L - L_0 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_0}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) t}.$$

Nach Trennung der Variablen:

$$K \cdot \frac{4}{b} \cdot \left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot t = L - L_0 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L}{L_0}.$$

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Für L führt man die relative Vergrößerung i von L_0 ein, indem man setzt:

$$L = i \cdot L_0.$$

Der Wert von i ist stets größer als eins und kann bei langen Zellen und den üblichen Versuchsverhältnissen allerhöchstens etwa drei werden, was bedeuten würde, daß sich der Protoplast dann auf die dreifache Länge von L_0 rückgedehnt hätte.

Auf gleiche Weise wird auch b durch L_0 substituiert:

$$b = j \cdot L_0.$$

Der Faktor j wird kleiner als eins bleiben, sofern die Kontraktion des Protoplasten nicht derart stark ist, daß die Vakuole Kugelgestalt annimmt und die Zellängswand nur an einem Kreisumfang berührt; j erreicht dann den Maximalwert eins.

Die Gleichung formt sich demnach um:

$$K \cdot \frac{4}{b} \cdot \left(L_0 - \frac{b}{3}\right) \cdot t = i \cdot L_0 - L_0 - \frac{j}{3} \cdot L_0 \cdot \ln(i).$$

Da der Quotient $\dfrac{K \cdot \frac{b}{4}\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)}{L_0}$ nur konstante Größen enthält und die Form der Rückdehnungskurve nicht bestimmt, wird er willkürlich gleich A gesetzt, so daß schließlich folgt:

$$A \cdot t = i - 1 - \frac{j}{3} \cdot \ln(i).$$

Diese Gleichung ist die allen Rückdehnungen gemeinsame Funktion von t und i, wobei für den Parameter j Werte von 0 bis 1 einzuführen sind: Die Rückdehnungskurve ist vom Verhältnis b/L_0 abhängig.

In Abb. 6 ist diese Funktion von t als reduziertes Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm dargestellt, wobei die Protoplastenlänge durch die relative Vergrößerung i angegeben ist und die für $A = 1$, $i = 2$ und $j = 0$ folgende Größe von t als Einheit gewählt wurde. Es sind vier Werte des Parameters j angenommen und für jeden einige Punkte der zugehörigen Rückdehnungskurve berechnet. Statt der Kurvenzüge wurden interpolierte Gerade eingezeichnet, die so gelegt sind, daß die Abweichungen von den Kurvenpunkten möglichst gering bleiben. Für $j = 0{,}00$ (d. h. also im Falle der Vernachlässigung des Gliedes $\frac{j}{3} \cdot \ln[i]$) folgt die Rückdehnung streng zeitproportional, während für den anderen Extrem-

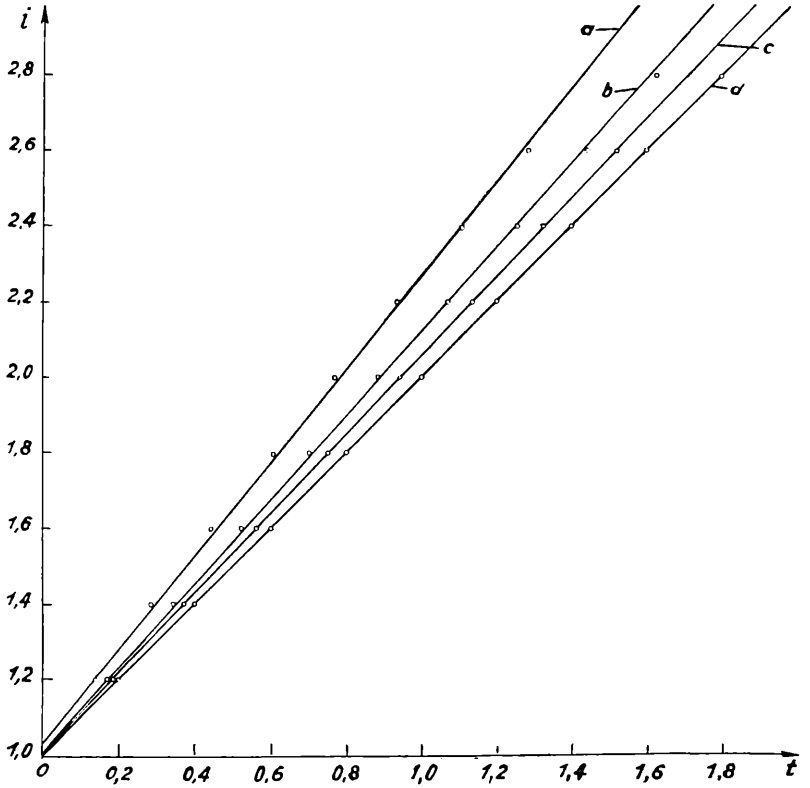

Abb. 6. Reduziertes Zeit-Protoplastenlängen-Diagramm.

Parameter j = 1,00: Interpolierte Gerade a
j = 0,50: b
j = 0,25: c
j = 0,00: d

Weitere Erklärungen siehe p. 782.

fall (j = 1,00) eine leicht gekrümmte Kurve resultiert, die von ersterer in ihrer Lage stark abweicht. Die dazwischenliegenden Kurven (j = 0,50; j = 0,25) sind noch weniger gekrümmt.

Da bei jeder Kurve die Abweichungen von der Geraden kleiner als fünf Prozent bleiben und im Experiment von den Meßfehlern überdeckt sind, ist unabhängig vom b/L_0-Verhältnis als erste Folgerung abzuleiten, daß die Rückdehnung

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

im Versuch zeitproportional erscheint. Demnach bleibt die Geschwindigkeit der Rückdehnung konstant und ist nicht von der Menge des Diosmotikum abhängig, das während des Versuchsablaufes in die Vakuole eindringt. Auf die Zeitproportionalität hat bereits Scarth (1939, p. 131) bei seiner vereinfachten Endgleichung hingewiesen.

Obwohl das Glied $\frac{j}{3} \cdot \ln(i)$ die Gesetzmäßigkeit der Rückdehnung nur unmerklich verändert, beeinflußt es den Wert von K oft stark: Vergleicht man z. B. für die relative Rückdehnung $i = 2$ aus der Bestimmungsgleichung $K = \frac{b}{4} \cdot \frac{i - 1 - \frac{j}{3} \cdot \ln(i)}{\left(1 - \frac{j}{3}\right) \cdot t}$ den Wert des Zählers $i - 1 - \frac{j}{3} \cdot \ln(i)$ mit und ohne Vernachlässigung des letzten Gliedes bei verschiedenen Werten von j, so folgt:

j	$i - 1 - \frac{j}{3} \cdot \ln(i)$	$i - 1$	Unterschied absolut	Unterschied in % von $(i - 1)$
1,0000	0,7690	1,0000	0,2310	23 %
0,5000	0,8845	1,0000	0,1155	12 %
0,2500	0,9422	1,0000	0,0578	6 %

Die Unterschiede nehmen bei größer werdendem i langsam ab. Da sie aber schon bei dem häufig vorkommenden Wert $j = 0{,}5$ (d. h. $b = \frac{1}{2} \cdot L_0$) über 10 Prozent betragen, erscheint es nicht angebracht, die Endformel allgemein zu vernachlässigen, sondern dies bei jedem Versuch einzeln zu entscheiden.

Außer der Zeitproportionalität kann aus der Gleichung (7) noch abgeleitet werden, welcher Art die Veränderungen des Rückdehnungsverlaufes sind, wenn es gelingt, eine Zelle bei gleichbleibenden Permeabilitätseigenschaften ihres Protoplasten in verschiedenen Konzentrationen des gleichen Diosmotikum rückdehnen zu lassen. Da dies (wie im zweiten Teil dieser Arbeit zu zeigen sein wird) tatsächlich möglich ist, ohne auf eine ausreichend genaue Protokollierung des Rückdehnungsverlaufes zu verzichten, ergibt sich daraus eine zweite Möglichkeit zur experimentellen Prüfung der Gleichung (7).

Aus Gleichung (4) kann man für $\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)$ ableiten:

$$\left(L_0 - \frac{b}{3}\right) = \frac{4}{\pi} \cdot \frac{m_u}{C} \cdot \frac{1}{b^2}.$$

Man substituiert diesen Wert in die Gleichung (8) und erhält:

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}}{t_2 - t_1} \cdot C \cdot \frac{b^2}{4} \cdot \pi \cdot \frac{1}{m_u}.$$

Hierin sind K, b, m_u und π Konstante, so daß man wieder setzen kann:

$$\text{Const.} = \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \ln \frac{L_2}{L_1}}{t_2 - t_1} \cdot C.$$

Bei gleich großen Zeitabschnitten $t_2 - t_1$ wird das Produkt

$$\left(L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}\right) \cdot C$$

eine Konstante: Es soll sich daher der Protoplast in verschiedenen Konzentrationen desselben Diosmotikum bei der höheren weniger zurückdehnen als bei der niedrigeren, d. h. die Rückdehnung verlangsamt sich bei Erhöhung der Außenkonzentration.

Mit der Zeitproportionalität und Konzentrationsabhängigkeit der Rückdehnung sind alle Folgerungen aus der Formel (7) abgeleitet, durch die eine Überprüfung dieser Endgleichung am Verhalten der Zelle im Versuch möglich wird. Eine solche Bestätigung ist offenbar von besonderem Wert. Gleichwohl findet man sie für die bisherigen Maße kaum angegeben und auch Scarth (1939, p. 131) erwähnt nur unveröffentlichte Versuche mit Harnstoff, in welchen Frazer die Zeitproportionalität der Rückdehnung tatsächlich vorfand. Es waren daher zur Prüfung der beiden Folgerungen genaue Versuche mit Anelektrolyten erwünscht, die im zweiten Teil dieser Arbeit mitgeteilt werden sollen.

Zu Permeabilitätsstudien wurde ich durch die Arbeiten meines hochgeschätzten Lehrers, Herrn Prof. K. Höfler, angeregt, dem ich auch für zahlreiche wertvolle Hinweise Dank schulde. Die theoretischen Überlegungen und Berechnungen begann ich 1944 in Wien und setzte sie seit 1945 in Innsbruck fort. Ich danke Herrn

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Prof. A. Sperlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Botanischen Institut der Universität Innsbruck. Herrn Prof. A. Pisek bin ich für das große Interesse und das außerordentliche Entgegenkommen, die Arbeit trotz längeren Unterbrechungen fertigstellen zu können, zu besonderem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Es wird ein Maß zur quantitativen Bestimmung der Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten für jene Fälle beschrieben, wo es sich um die Endosmose von osmotisch wirksamen, nicht dissoziierbaren Kristalloiden in künstlichen Milieus und bei Fehlen von Energieaufwand handelt. Nach einer Aufzählung bisher benutzter Permeabilitätsmaße wird aus dem Fickschen Gesetz eine Differentialgleichung abgeleitet, welche einen Faktor als Maß für die Stoffpermeabilität enthält. Es werden die Druck- und Konzentrationsverhältnisse bei Permeabilitätsversuchen diskutiert und dabei vier verschiedene Phasen unterschieden: Die Anfangsphase, die Kontraktionsphase, die Rückdehnungsphase und die Endphase. Für die Menge und die Partialkonzentration des permeierten Diosmotikum sind Formeln zu ihrer Berechnung angegeben.

Die Endformel für das Permeabilitätsmaß, die für zylindrische Zellen aus der Differentialgleichung folgt, lautet:

$$K = \frac{b}{4} \cdot \frac{L_2 - L_1 - \frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}}{\left(L_0 - \frac{b}{3}\right)(t_2 - t_1)}.$$

Alle Meßgrößen (L = Protoplastenlänge, b = Zellbreite, t = Zeit) folgen direkt aus dem Experiment. Durch Vernachlässigung des Gliedes $\frac{b}{3} \cdot \ln \frac{L_2}{L_1}$ ergibt sich eine von Scarth (1939) auf anderem Weg ermittelte Gleichung, doch ist diese Vereinfachung nicht durchwegs empfehlenswert. Für die Art des Rückdehnungsverlaufes lassen sich aus der Endformel zwei Gesetzmäßigkeiten ableiten (Zeit-Proportionalität der Rückdehnung und Verlangsamung der Rückdehnung bei Erhöhung der Außenkonzentration).

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wird mit Hilfe einer (a. a. O. beschriebenen) verbesserten Durchströmungskammer zu untersuchen sein, ob diese Gesetzmäßigkeiten experimentell bestätigt werden.

Literatur.

Bachmann, F., 1939: Zur Analyse von Permeabilitätsmessungen I. Wasserpermeabilität. Planta **30**, 224.

Bärlund, H., 1929: Permeabilitätsstudien an Epidermiszellen von Rhoeo discolor. Acta Bot. Fenn., **5**, 7.

Bochsler, A., 1948: Die Wasserpermeabilität des Portoplasmas auf Grund des Fickschen Diffusionsgesetzes. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **58**, 73 und Büchler u. Co. Bern.

Brooks, S. C. and Brooks, M. M., 1941: The permeability of living Cells. Protopl. Monogr. Bd. 19. Borntraeger, Berlin.

Collander, R. und Bärlund, H., 1933: Permeabilitätsstudien an Chara ceratophylla. II. Die Permeabilität für Nichtelektrolyte. Acta Bot. Fenn., **11**, 1.

Delf, E. M., 1916: Studies of protoplasmic permeability by measurement of rate of shrinkage of turgid tissues. Ann. of Botany, **30**, 283.

Eggert, J., 1948: Lehrb. d. physikal. Chemie, Hirzelverlag, Zürich.

Elo, J. E., 1939: Zur Kenntnis der Permeabilitätseigenschaften von Hippuris vulgaris L. Protoplasma, **32**, 423.

Fick, A., 1855: Über Diffusion. Poggendorffs Ann., **94**, 59.

Fitting, H., 1915: Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. Jahrb. wiss. Bot., **56**, 1.

— 1919: Untersuchungen über die Aufnahme und über anomale osmotische Koeffizienten von Glycerin und Harnstoff. Jahrb. wiss. Bot., **59**, 1.

Frey-Wyssling, A., 1945: Die Turgorschwankung bei Permeabilitätsversuchen. Verh. naturforsch. Ges. Basel, **56**, II, 330.

— 1946: Zur Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Experientia II/4, 132.

Frey-Wyssling, A. und Bochsler, A., 1947: Zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Experientia, III/1, 30.

Hirth, L., 1944: Etude de l'influence de la température sur la pénétration de diverses substances dans les cellules de la gaine foliaire de Ranunculus repens. Editions scientifiques Riber, Paris.

Höfler, K., 1917: Die plasmolytisch-volumometrische Methode und ihre Anwendbarkeit zur Messung des osmotischen Wertes lebender Pflanzenzellen. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **35**, 706.

— 1918 a: Permeabilitätsbestimmung nach der plasmometrischen Methode. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **36**, 414.

— 1918 b: Eine plasmolytisch-volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes von Pflanzenzellen. Denkschr. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., **95**, 99.

— 1918 c: Über die Permeabilität der Stengelzellen von Tradescantia elongata für Kalisalpeter. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **36**, 423.

— 1920: Ein Schema für die osmotische Leistung der Pflanzenzelle. Ber. Deutsch. Bot. Ges.. **38**, 288.

— 1930: Über Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse und eine Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasten. Jahrb. wiss. Bot., **73**, 300.

— 1934: Permeabilitätsstudien an Stengelzellen von Majanthemum bifolium. (Zur Kenntnis spezifischer Permeabilitätsreihen, I.) Akad. Wiss., Wien, math.-naturw. Kl. Abt. I. **143**, 213.

— 1949: Über Wasser- und Harnstoffpermeabilität des Protoplasmas. Phyton, **1**, 105.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Höfler, K. und Weber, F., 1926: Die Wirkung der Äthernarkose auf die Harnstoffpermeabilität von Pflanzenzellen. Jahrb. wiss. Bot., **65**, 649.

Hofmeister, L., 1935: Vergleichende Untersuchungen über spezifische Permeabilitätsreihen. Bibliotheca Botanica, **113**, 1.

— 1938: Verschiedene Permeabilitätsreihen bei einer und derselben Zellsorte von Ranunculus repens. Jahrb. wiss. Bot. **86**, 401.

Huber, B., 1943: Zur Theorie der spezifischen Permeabilitätsreihen. Protoplasma, **37**, 439.

Huber, B. und Höfler, K., 1930: Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jahrb. wiss. Bot., **73**, 351.

Huber, B. und Schmidt, H., 1933: Plasmolyse und Permeabilität. Protoplasma, **20**, 209.

Jacobs, M. H., 1927: The exchange of materials between the erythrocyte and its surroundings. The Harvey Lectures, **22**, 146.

— 1932: The simultaneous measurement of cell permeability to water and dissolved substances. Journ. of Cell. and Comp. Physiol., **2**, 427.

Jacobs, M. H. and Stewart, D. R, 1932: A simple method for the quantitative measurement of cell permeability. Journ. of Cell. Comp. Physiol., **1**, 71.

Järvenkylä, Y. T., 1937: Über den Einfluß des Lichtes auf die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten. Annales Botanici Societatis Zoologicae-Botanicae Fennicae Vanamo, **9**, 1.

Klebs, G., 1887 a: Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. Unters. a. d. Bot. Inst. z. Tübingen, **2**, 489.

— 1887 b: Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **5**, 181.

Kreuz, J., 1941: Der Einfluß von Calzium- und Kalium-Salzen auf die Permeabilität des Protoplasmas für Harnstoff und Glycerin. Österr. Bot. Zeitschr., **90**, 1.

Lepeschkin, W. W., 1908 a: Zur Kenntnis des Mechanismus der Variationsbewegungen. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **26**, 724.

— 1908 b: Über den Tugordruck der vakuolisierten Zellen. Ber. Deutsch. Bot. Ges, **26** a, 198.

— 1938: Über die Anwendung der Methode der isotonischen Konzentrationen bei der Ermittlung von Permeabilitätsänderungen des Pflanzen- und Tierplasmas. Protoplasma, **30**, 529.

Levitt, J., Scarth, G. W., Gibbs, R. D., 1936: Water permeability of isolated protoplasts in relation to volum change. Protoplasma, **26**, 237.

Noyes, A. A. und Whitney, W. R., 1897: Über die Auflösungsgeschwindigkeit von festen Stoffen in ihren eigenen Lösungen. Ztschr. physikal. Chem., **23**, 689.

Overton, E., 1899: Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie. Vierteljahrschr. Naturf. Ges. Zürich, **44**, 88.

Renner. O., 1912: Über die Berechnung des osmotischen Druckes. Biolog. Zentralbl., **32**, 486.

Resühr, B., 1935: Zur mathematischen Behandlung der Stoffaufnahme lebender Protoplaste. Protoplasma, **25**, 435.

Reuter, L., 1943: Die Harnstoffpermeabilität der Schließzellen. Versuch eines quantitativen Nachweises der Permeabilität der Schließzellen. Protoplasma, **37**, 538.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Rottenburg, W., 1943: Die Plasmapermeabilität für Harnstoff und Glycerin in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffjonenkonzentration. Flora, N F. **37**, 230.
Ruhland, W. und Hoffmann, C., 1925: Die Permeabilität von Beggiatoa mirabilis. Ein Beitrag zur Ultrafiltertheorie des Plasmas. Planta **1**, 1.
Runnström, J., 1911: Untersuchungen über die Permeabilität des Seeigeleies für Farbstoffe. Arkiv för Zoologi, **7**, 13, 1.
Rysselberghe, F. van, 1901: Influence de la temperature sur la perméabilité de protoplasme vivant pour l'eau et les substances dissoutes. Rec. de l'Inst. Bot. Brüssel, **5**, 209.
Scarth, G. W., 1939: Estimation of protoplasmic permeability from plasmolytic tests. Plant Physiol., **14**, 129.
Schmidt, H., 1936: Plasmolyse und Permeabilität. Jahrb. wiss. Bot., **83**, 470.
Sebor, J., 1904: Über die Diffusionsgeschwindigkeit von Wasser durch eine halbdurchlässige Membran. Zeitschr. f. Elektrochem., **10**, 351.
Seemann, F., 1950: Der Einfluß der Wärme und UV-Bestrahlung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasma. Protoplasma, **39**, 535.
Stadelmann, E., 1951 a: Eine verbesserte Durchströmungskammer und deren Anwendung zur Prüfung eines Maßes für die Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. Diss. Univ. Innsbruck.
— 1951 b: Eine verbesserte Durchströmungskammer. Protoplasma. **40**, 617.
Steward, F. C., 1932/33: The absorption and accumulation of solutes by living plant cells. Protoplasma, **15**, 29, 497; **16**, 576; **17**, 436; **18**, 208.
Steward, F. C., Wright R., Berry, W. E., 1932: The respiration of discs of potato tissue in air and immersed in salt solutions with observations on surface volume effects and salt accumulation. Protoplasma, **16**, 576.
Stiles, W. and Jörgensen, J., 1917: Studies in Permeability. V. Ann. of Bot., **31**, 415
Stöger, E., 1950: Zur Permeabilität der Schließzellen. Protoplasma, **39**, 588.
Ursprung, A., 1926: Über die gegenseitigen Beziehungen der osmotischen Zustandsgrößen. Planta, **2**, 640.
Ursprung, A. und Blum. G., 1916: Über die Verteilung des osmotischen Wertes in der Pflanze. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **34**, 88.
Vries, de, H., 1888: Über den isotonischen Koeffizienten des Glycerins. Bot. Ztg., **46**, 229.
— 1889: Über die Permeabilität der Protoplaste für Harnstoff. Bot. Ztg., **47**, 309.
Wartiovaara. V., 1942: Über die Temperaturabhängigkeit der Protoplasmapermeabilität. Annales Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. Vanamo, **16**, No. 1
— 1949: The permeability of the plasma membranes of Nitella to normal primary alcohols at low and intermediate temperatures. Physiol. Plantarum, **2**, 184.